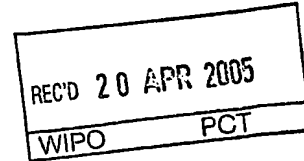


10/585923

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E



PCT/FR 2005/050083



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

BEST AVAILABLE COPY

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

\_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

2



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Frédérique DENJEAN bioMérieux Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE France
Vos références pour ce dossier: COAGULAM	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>	
Demande de brevet	
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>	
Procédé de diagnostic/pronostic d'une thrombose	
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>	Pays ou organisation      Date      N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>	
Nom	BIOMÉRIEUX
Rue	Chemin de l'Orme
Code postal et ville	69280 Marcy l'Etoile
Pays	France
Nationalité	France
Forme juridique	Société anonyme
N° SIREN	673 620 399
N° de téléphone	04.78.87.53.28
N° de télécopie	04.78.87.21.16
Courrier électronique	catherine.duret@eu.biomerieux.com
<b>5A MANDATAIRE</b>	
Nom	DENJEAN
Prénom	Frédérique
Qualité	Liste spéciale, Pouvoir général: 10870
Cabinet ou Société	bioMérieux
Rue	Chemin de l'Orme
Code postal et ville	69280 MARCY L'ETOILE
N° de téléphone	04.78.87.75.70
N° de télécopie	04.78.87.21.16
Courrier électronique	frederique.denjean@eu.biomerieux.com

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails	
Texte du brevet		textebrevet.pdf	25	D 21, R 3, AB 1	
Dessins		dessins.pdf	4	page 4, figures 4	
Listage des sequences, PDF		seqpdf.pdf			
Listage des sequences, ASCII		seqtxt.txt			
Désignation d'inventeurs					
Pouvoir général					
7 MODE DE PAIEMENT					
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant			
Numéro du compte client		3189			
8 RAPPORT DE RECHERCHE					
Etablissement immédiat					
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt		EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	2.00	30.00
Total à acquitter		EURO			350.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, BIOMERIEUX, F.Denjeau

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

1er dépôt



R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E

## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

### Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	12 février 2004	Dépôt en ligne: X Dépôt sur support CD:
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0450257	
Vos références pour ce dossier	COAGULAM	

#### DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	BIOMÉRIEUX
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

#### TITRE DE L'INVENTION

Procédé de diagnostic/pronostic d'une thrombose

#### DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	seq1txt.txt
FR-office-specific-info.xml	Comment.PDF	textebrevet.pdf
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	request.xml
seq1pdf.pdf	application-body.xml	

#### EFFECTUE PAR

Effectué par:	F.Denjan
Date et heure de réception électronique:	12 février 2004 17:34:57
Empreinte officielle du dépôt	31:4C:1B:2F:CA:27:A2:D0:84:02:7C:2A:9B:80:E7:35:AE:13:5A:DC

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL  
INSTITUT 26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
NATIONAL DE 75000 PARIS cedex 09  
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04  
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL CREE PAR LA LOI No 51-444 DU 19 AVRIL 1951

La présente invention concerne un procédé in vitro pour le diagnostic/pronostic de la thrombose. L'invention concerne également des amorces d'amplification et des sondes d'hybridation qui peuvent être mises en oeuvre dans ce procédé, ainsi qu'un kit de diagnostic/pronostic d'une thrombose.

5

La coagulation est un système homéostatique essentiel qui doit être correctement régulé afin d'éviter les hémorragies aussi bien que les thromboses.

Cette coagulation fait intervenir une cascade d'activations de précurseurs circulants inactifs qui, par perte d'une extrémité de leur chaîne protéique donnent des facteurs  
10 activés. Parmi ces facteurs de coagulation, on peut citer notamment le facteur II et le facteur V. Le facteur II, également appelé prothrombine, est une pro-enzyme synthétisée par le foie. Elle est activée en thrombine, forme active, par les facteurs X et V activés en présence de phospholipides. Quand elle est activée, elle est responsable de la protéolyse du fibrinogène en fibrine.

15 Parmi les altérations connues de l'hémostase, on peut citer notamment les thromboses artérielles, qui se manifestent sous formes d'infarctus du myocarde, d'attaques, et par des maladies artérielles périphériques, ainsi que les thromboses emboliques veineuses qui sont des causes majeures de morbidité et de mortalité. Des mutations des gènes codant les facteurs II et V seraient des facteurs de risque de ces altérations. Ainsi, en  
20 1996, l'étude des régions codantes et adjacentes du gène codant le facteur II, dans une famille avec différents individus atteints de thrombose veineuse, a permis de mettre en évidence une mutation à la position 20210 du gène (ci après appelé mutation 20210). Cette mutation entraîne une augmentation de 25% de l'activité de la thrombine dans le plasma et est considérée comme un facteur de risque aux thromboses veineuses.

25 La mutation du nucléotide 1691 du gène codant le facteur V, appelée mutation Leiden du facteur V est également un facteur de risque. Cette mutation augmente le risque de thrombose veineuse de 4 à 8 fois chez les individus hétérozygotes et de 50 à 100 fois pour les homozygotes.

30 Une détection précoce des mutations 20210 du facteur II et la mutation Leiden du facteur V est donc essentielle afin de prévenir le plus tôt possible les risques de thrombose veineuse. De plus, de nombreuses études montrent que la mutation 20210 du facteur II et la mutation Leiden du facteur V sont souvent cohéritées et la présence des

deux mutations induit une augmentation du risque de thrombose veineuse. Il est donc également important d'étudier ces deux mutations simultanément.

5 Le brevet US 6 558 913 présente une méthode pour détecter la présence d'un risque génétique de thrombose, basée sur la détection de la mutation Leiden du facteur V. On peut également citer le brevet US 6 043 035 qui présente une méthode pour détecter la présence d'un risque génétique de thrombose, basée sur la détection de la mutation 20210 du facteur II. Ces méthodes comprennent notamment une étape d'amplification de la région du gène dans laquelle est située la mutation, par l'utilisation d'amorces  
10 d'amplification, suivie d'une étape de détection de la mutation par l'utilisation d'une sonde de détection spécifique de la mutation.

Ces méthodes ne permettent toutefois pas la détection simultanée de la mutation Leiden du facteur V et la mutation 20210 du facteur II, qui augmente pourtant grandement le risque de thrombose chez un patient. La détection précoce de cette double mutation, qui  
15 peut se faire séquentiellement ou séparément, permet de prévenir le patient et lui proposer un traitement adapté. De plus, ces méthodes peuvent être optimisées par le choix des amorces d'amplification utilisées lors de l'étape d'amplification, afin d'améliorer l'étape de détection, et cela d'autant plus lors que l'étape d'amplification est réalisée simultanément à l'étape de détection.

20 A ce titre, la présente invention se propose d'améliorer l'état de la technique en proposant un nouveau procédé pour évaluer le risque de thrombose d'un patient. Ce procédé met notamment en œuvre lors de l'étape d'amplification de nouvelles amorces d'amplification parfaitement adaptée pour la détection d'une mutation augmentant le risque de thrombose. Ces nouvelles amorces d'amplification peuvent de plus être  
25 utilisées au sein de la même réaction d'amplification, ce qui permet notamment de déterminer par une réaction unique la présence des mutations 20210 du facteur II et la mutation Leiden du facteur V.

A ce titre, l'invention concerne un procédé in vitro pour le diagnostic/pronostic d'une  
30 thrombose comprenant les étapes suivantes :

A - on extrait le matériel nucléaire d'un échantillon biologique,

B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire,

C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons,

- 5 caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 ; 3 à 8.

Au sens de la présente invention, on entend par diagnostic/pronostic d'une thrombose, l'établissement d'un profil de risque génétique de la thrombophilie.

- 10 Au sens de la présente invention, on entend par échantillon biologique, tout échantillon susceptible de contenir un matériel nucléaire tel que défini ci après. Cet échantillon biologique peut être prélevé chez un patient et peut être notamment un échantillon de tissus, de sang, de sérum, de salive, de cellules circulantes du patient. On dispose de cet échantillon biologique par tout type de prélèvement connu de l'homme du métier.

- 15 Au sens de la présente invention, le matériel nucléaire comprend une séquence d'acides nucléiques telle que séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou d'acides ribonucléiques (ARN). Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléaire comprend une séquence d'acides désoxyribonucléiques. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléaire est extrait d'un échantillon

- 20 biologique prélevé chez un patient. Par séquence nucléotidique (ou séquences d'acides nucléiques ou fragment nucléotidique ou oligonucléotide, ou polynucléotide), on entend un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à une autre séquence d'acides nucléiques,

- 25 l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique. Par motif nucléotidique, on entend un dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ADN le

- 30 sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins



- des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates. Ce matériel nucléique comprend au moins une séquence cible.
- 10 Par séquence cible, on entend une séquence dont l'enchaînement en motifs nucléotidiques est spécifique d'un gène cible, tel que préférentiellement le gène codant le facteur II ou le gène codant le facteur V. Au sens de la présente invention, la séquence cible comprend une mutation qui augmente le risque de thrombose telle que notamment la mutation Leiden du facteur V ou la mutation 20210 du facteur II. Dans la
- 15 suite de l'exposé, on parlera de séquence cible qu'elle soit en simple brin ou en double brin.
- Lors de l'étape A, on extrait le matériel nucléique d'un échantillon biologique par tout protocole connu de l'homme du métier. A titre indicatif, l'extraction d'acides nucléique peut être réalisée par une étape de lyse des cellules présentes dans l'échantillon
- 20 biologique, afin de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des cellules (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet WO00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique, WO99/53304 sur la lyse électrique, et WO99/15321 sur la lyse mécanique.
- 25 L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US 5,234,809). Cette étape de lyse peut également être suivie d'une étape de purification, permettant la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet
- 30 généralement de concentrer les acides nucléiques, et peut être adapté à la purification d'ADN ou d'ARN. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet

- les brevets US 4,672,040 et US 5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO97/45202 et WO99/35500. Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne, soit sous forme de particules inertes (Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503) ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).
- Lorsque l'on souhaite extraire spécifiquement l'ADN d'un échantillon biologique, on peut notamment réaliser une extraction par du phénol, du chloroforme et de l'alcool pour éliminer les protéines et précipiter l'ADN avec de l'alcool. L'ADN peut alors être culoté par centrifugation, lavé et remis en suspension.
- Lors de l'étape B on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire.
- Au sens de la présente invention, on entend par amorce d'amplification, une séquence nucléique comprenant de 10 à 100 motifs nucléotidiques, préférentiellement de 15 à 25 motifs nucléotidiques. Cette amorce d'amplification comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°1 ; 3 à 8
- Au sens de la présente invention, une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de
- o une séquence homologue à la SEQ ID N°1 ; 3 à SEQ ID N°8, c'est à dire
  - o la séquence complémentaire de la SEQ ID N°1 ; 3 à 8

- une séquence présentant une homologie suffisante pour s'hybrider à la SEQ ID N°1 ; 3 à SEQ ID N°8 ou à la séquence complémentaire à la SEQ ID N°1 ; 3 à SEQ ID N°8,
  - une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 ; 3 à SEQ ID N°8 (ou une séquence homologue à SEQ ID N°1 ; 3 à SEQ ID N°8 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases thymine,
- et qui aurait la même fonction que l'amorce d'amplification selon l'invention, c'est à dire amplifier tout ou partie du gène codant le facteur V (SEQ ID N°1 ; 3 à 4) susceptible de contenir la mutation Leiden ou tout ou partie du gène codant le facteur II (SEQ ID N°5 à 8), susceptible de contenir la mutation 20210, est considérée comme équivalente à l'amorce d'amplification selon l'invention.
- Une paire d'amorces d'amplification permet l'initiation d'une polymérisation enzymatique, telle que notamment une réaction d'amplification enzymatique.
- Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies (ou amplicons) d'une séquence nucléique par l'action d'au moins une enzyme. Au sens de la présente invention, on entend par amplicons les copies de la séquence cible obtenues lors d'une réaction d'amplification enzymatique. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment la PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159 ; la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184 ; la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069 ; la 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995 ; la NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, ou encore la TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.
- D'une manière générale, ces réactions d'amplification enzymatique mettent généralement une succession de cycle comprenant les étapes suivantes :
- la dénaturation de la séquence cible si celle ci est en double brin afin d'obtenir deux brins cibles, complémentaires,
  - l'hybridation de chacun des brins cibles, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente avec au moins une amorce d'amplification ,

- o la formation à partir des amorces d'amplification des brins complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'une enzyme polymérase et de nucléosides triphosphate (ribonucléoside triphosphate et/ou desoxyribonucléoside triphosphate selon les techniques)
- 5 ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir la séquence cible dans une proportion suffisante pour permettre sa détection.
- Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux séquences nucléiques telle que notamment une amorce d'amplification et une séquence cible ou une sonde d'hybridation et une séquence cible,
- 10 se lie avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques pour former un double brin. Ces liaisons hydrogènes se forment entre les bases complémentaires Adénine (A) et thymine (T) (ou uracile (U)) (on parle de liaison A-T) ou entre les bases complémentaires Guanine (G) et cytosine (C) (on parle de liaison G-C). L'hybridation de deux séquences nucléiques peut être totale (on parle alors de séquences
- 15 complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu lors de cette hybridation comprend uniquement des liaisons A-T et des liaisons C-G. Cette hybridation peut être partielle (on parle alors de séquences suffisamment complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu comprend des liaisons A-T et des liaisons G-G permettant de former le double brin, mais également des bases non liées à une base complémentaire.
- 20 L'hybridation entre deux séquences complémentaires ou suffisamment complémentaires dépend des conditions opératoires qui sont utilisées, et notamment de la stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases des deux séquences nucléiques, ainsi que par le degré de mésappariement entre ces deux séquences nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la
- 25 réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.
- D'une façon plus précise, la NASBA est une technologie d'amplification isotherme de
- 30 l'acide nucléique reposant sur l'action conjointe de trois enzymes (transcriptase inverse AMV, Rnase-H et polymérase-ARN T7). Associée à des amorces d'amplification spécifiques d'une séquence cible, elle amplifie les cibles ARN plus d'un milliard de fois

en 90 minutes. La réaction d'amplification se produit à 41°C et donne des molécules d'ARN simple brin comme produit final. La NASBA nécessite une paire d'amorce, dont au moins une comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

- 5 Lors de l'étape C, on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons. Préférentiellement, cette sonde de détection permet de détecter non seulement la présence desdits amplicons, mais permet également de détecter la présence d'une mutation donnée, susceptible d'être comprise dans l'amplicon.

Cette étape de détection, peut être réalisée par tous les protocoles connus de l'homme du métier concernant la détection d'acides nucléiques.

- 10 Au sens de la présente invention, on entend par sonde d'hybridation, une séquence nucléique possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec une séquence nucléique cible. La sonde d'hybridation peut comprendre un marqueur permettant sa détection. On parle alors de
- 15 sondes de détection. Par détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une détection indirecte par une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6,
- 20 p.173-249]. Par marqueur, on entend un traceur capable d'engendrer un signal que l'on peut détecter. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêta galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; les chromophores comme les
- 25 composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par
- 30 des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

La sonde de détection peut être notamment une sonde de détection « molecular beacons » telle que décrite par Tyagi & Kramer (Nature biotech, 1996, 14 :303-308). Ces "molecular beacons" deviennent fluorescentes lors de l'hybridation. Elles possèdent une structure de type tige-boucle et contiennent un fluorophore et un groupe inhibiteur ou "quencher". La fixation de la séquence de boucle spécifique avec sa séquence complémentaire d'acide nucléique cible provoque un déroulement de la tige et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde qui convient. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la sonde de détection comprend un fluorophore et un quencher. Selon un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, la sonde d'hybridation comprend un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) ou ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en son extrémité 5' et un quencher (Dabsyl) en son extrémité 3'. Dans la suite de l'exposé, une telle sonde d'hybridation est appelée « molecular beacon ».

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on détecte, lors de l'étape C) la présence ou l'absence de la mutation Leiden du facteur V. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on détecte, lors de l'étape C) la présence ou l'absence ou de la mutation 20210 du facteur II. Selon un mode encore plus préféré, on détecte simultanément la présence ou l'absence de la mutation Leiden du facteur V et de la mutation 20210 du facteur II.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, lors de l'étape C), ladite sonde de détection comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°9 à 12. Ainsi, l'utilisation d'une sonde de détection comprenant la SEQ ID N° 9 permet de diagnostiquer la présence de la mutation Leiden du facteur V, alors que l'utilisation d'une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°10 permet de diagnostiquer l'absence de la mutation Leiden du facteur V. De même, l'utilisation d'une sonde de détection comprenant la SEQ ID N° 11 permet de détecter la présence de la mutation 20210 du facteur II, alors que l'utilisation d'une sonde de détection comprenant la SEQ ID N°12 permet de détecter l'absence de la mutation 20210 du facteur II.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, lors de l'étape B, ladite paire d'amorces est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un  
10      amplicon, spécifique du gène codant le facteur V, d'une taille de 159 paires de base, qui correspond à la séquence 36568-36726 sur la séquence du gène codant le facteur V de référence (NT\_004668). Cette amplicon peut contenir l'allèle mutée responsable de la mutation Leiden ou l'allèle sauvage, l'allèle étant caractérisée lors de l'étape C.
- 15      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ  
20      ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur V, d'une taille de 374 paires de base, qui correspond à la séquence 36568-36941 sur la séquence du gène codant le facteur V de référence (NT\_004668). Cette amplicon peut contenir l'allèle mutée responsable de la mutation Leiden ou l'allèle sauvage , l'allèle étant  
25      caractérisée lors de l'étape C.
- 30      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID

- N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 145 paires de base, qui correspond à la séquence 21455-21599 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696). Cette amplicon peut contenir l'allèle mutée responsable de la mutation 20210 du facteur II ou l'allèle sauvage , l'allèle étant caractérisée lors de l'étape C.
- 5
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce
- 10 d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 434 paires de
- 15 base, qui correspond à la séquence 21217-21650 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696). Cette amplicon peut contenir l'allèle mutée responsable de la mutation 20210 du facteur II ou l'allèle sauvage , l'allèle étant caractérisée lors de l'étape C.
- 20 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Préférentiellement, cette première amorce d'amplification comprend une séquence choisie parmi les séquences de SEQ ID N° 13 à 14.
- 25
- Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'étape B et l'étape C sont réalisées simultanément. Ceci peut être mise en œuvre notamment par une réaction d'amplification NASBA avec détection en temps réel. La détection en temps réel des amplicons peut être réalisée par l'utilisation d'un lecteur Nuclisens EasyQ®
- 30 (bioMérieux BV, The Netherlands) et sondes de détection «molecular beacons », telles que définies précédemment. D'une manière générale, l'amplification d'ADN en NASBA peut s'effectuer de la manière suivante : l'ADN est dénaturé à 95°C pour



- permettre la fixation d'une « première amorce », comprenant un promoteur de la polymérase T7 (une seule amorce est présente à ce stade). A 41°C, l'enzyme reverse transcriptase (AMV-RT) est ajoutée et permet l'extension de l'amorce. Puis une « deuxième amorce » est ajoutée et une nouvelle dénaturation est effectuée. Une
- 5 alternative est réalisée en ajoutant simultanément les deux amorces, afin de ne réaliser qu'une seule étape de dénaturation. Après cette phase d'initiation, la NASBA rentre dans un phase cyclique : la « deuxième amorce » s'hybride à une nouvelle molécule d'ARN formée ; l'AMV-RT étend cette amorce ; la RNase H dégrade l'ARN des hybrides ARN/ADNc ; une « première amorce » se fixe sur l'ADNc obtenu ; l'AMV-
- 10 RT synthétise à partir de celui-ci un nouveau brin complémentaire puis à partir de ce brin, étend la partie T7 de la « première amorce » ; ainsi la T7 RNA polymérase possède de nouvelles matrices avec une double queue T7 pour générer les ARNs. Lorsque le « molecular beacon » est en solution, le quencher, à proximité du fluorophore, inhibe sa fluorescence. En présence de l'acide nucléique cible, le beacon va se fixer sur la
- 15 séquence complémentaire à celle de la boucle. Il va donc changer de conformation et s'ouvrir, éloignant le fluorophore du quencher et permettant ainsi l'émission de fluorescence. Au cours de l'amplification, de nombreuses molécules vont être synthétisées permettant à autant de « molecular beacons » de se fixer. La fluorescence va donc augmenter au cours de la réaction. Un appareil approprié, comme l'EasyQ
- 20 Nuclisens Analyser, permet d'enregistrer la fluorescence au cours du temps.

- L'invention concerne également une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15, et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N° 1 ; 3 à 8.
- 25 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'amorce d'amplification comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Préférentiellement, une telle amorce d'amplification comprend une séquence choisie parmi les séquences de SEQ ID N° 13 à 14.
- 30 L'invention concerne également une paire d'amorce d'amplification choisie parmi les paires d'amorces suivantes :

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur V, d'une taille de 159 paires de base, qui correspond à la séquence 36568-36726 sur la séquence du gène codant le facteur V de référence (NT\_004668).
- 10      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur V, d'une taille de 374 paires de base, qui correspond à la séquence 36568-36941 sur la séquence du gène codant le facteur V de référence (NT\_004668).
- 15      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 145 paires de base, qui correspond à la séquence 21455-21599 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696).
- 20      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 145 paires de base, qui correspond à la séquence 21455-21599 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696).
- 25      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 145 paires de base, qui correspond à la séquence 21455-21599 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696).
- 30      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 145 paires de base, qui correspond à la séquence 21455-21599 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696).

14

5 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant le facteur II, d'une taille de 434 paires de base, qui correspond à la séquence 21217-21650 sur la séquence du gène codant le facteur II de référence (AF478696).

10 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Préférentiellement, cette première amorce d'amplification comprend une séquence choisie parmi les séquences de SEQ ID N° 13 à 14.

15 L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce d'amplification telle que définie précédemment et/ou d'une paire d'amorce telle que définie précédemment lors d'une réaction d'amplification NASBA

20 L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce telle que définie précédemment, et/ou d'au moins une paire d'amorces telle que définie précédemment pour le diagnostic/pronostic d'une thrombose.

25 L'invention concerne enfin un kit pour le diagnostic/pronostic d'une thrombose veineuse comprenant au moins une amorce telle que définie précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorces telle que définie précédemment.

Les figures suivantes sont données à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Elles permettront de mieux comprendre l'invention.

30 Les figures 1 et 2 représentent le génotypage de différentes lignées cellulaires pour la mutation +1691 G/A du Facteur V, grâce à la présence simultanée des molecular beacons de SEQ ID N°10 et SEQ ID N° 9 dans le mélange réactionnel.

Ainsi, la figure 1a représente le génotypage de la lignée cellulaire GM16000C, homozygote pour l'allèle sauvage (+1691-G) du Facteur V, alors que la figure 1b représente le génotypage de la lignée cellulaire GM14899, homozygote pour l'allèle muté (+1691-A) du Facteur V. Les carrés blancs représentent la détection de la fluorescence du « molecular beacons » de SEQ ID N°9, permettant de mettre en évidence l'allèle sauvage du facteur V, alors que les triangles noirs représentent la détection de la fluorescence du « molecular beacons » de SEQ ID N°10, permettant la détection de l'allèle mutée (mutation Leiden).

La figure 2 représente le génotypage de la lignée cellulaire GM16028B, hétérozygote pour la mutation +1691 du Facteur V. Les carrés blancs représentent la détection de la fluorescence du « molecular beacons » de SEQ ID N°9, permettant de mettre en évidence l'allèle sauvage du facteur V, alors que les triangles noirs représentent la détection de la fluorescence du « molecular beacons » de SEQ ID N°10, permettant la détection de l'allèle mutée (mutation Leiden).

Les figures 3 et 4 représentent le génotypage de différentes lignées cellulaires pour la mutation +20210 G/A du Facteur II, grâce à la présence simultanée des molecular beacons OGH 916 (SEQ ID N° 11, +20210-A) et OGH 1104 (SEQ ID N° 12, +2010-G) dans le mélange réactionnel.

A ce titre, la figure 3a représente le génotypage de la lignée cellulaire GM14899, homozygote pour l'allèle sauvage (+20210-G) du Facteur II alors que la figure 3b représente le génotypage de la lignée cellulaire GM16000C, homozygote pour l'allèle muté (+20210-A) du Facteur II. Les croix représentent la détection du « molecular beacons » de SEQ ID N°12, permettant la mise en évidence de l'allèle sauvage, alors que les ronds représentent la détection du « molecular beacons » de SEQ ID N°11, permettant la détection de la mutation 20210 du facteur II.

La figure 4 représente le génotypage de la lignée cellulaire GM16028B, hétérozygote pour la mutation +20210 du Facteur II. On détecte bien la présence de l'allèle muté (ronds noirs) et de l'allèle sauvage (courbe en croix). Les croix représentent la détection du « molecular beacons » de SEQ ID N°12, permettant la mise en évidence de l'allèle sauvage, alors que les ronds représentent la détection du « molecular beacons » de SEQ ID N°11, permettant la détection de la mutation 20210 du facteur II.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

### 1/ Echantillon et extraction de l'ADN

- 5 Le procédé selon l'invention a été validé sur des lignées cellulaires, ainsi que sur des échantillons cliniques de patients.

*Lignées cellulaires* - Trois lignées cellulaires lymphoblastoïdes de génotype connu pour les mutations Leiden du Facteur V et la mutation 20210 du facteur II (Coriell cell repository) ont été utilisées:

- 10 La lignée GM14899 n'exprime que la mutation Leiden du facteur V: cette lignée est homozygote pour la mutation Leiden du facteur V (A/A) et homozygote pour l'allèle sauvage en position 20120 du facteur II (G/G). La lignée GM16000C n'exprime que la mutation 20210 du facteur II: cette lignée est homozygote pour la mutation 20210 du facteur II (A/A) et homozygote pour l'allèle sauvage en position 1691 du facteur V (G/G). La lignée GM16028B est hétérozygote pour les 2 mutations (G/A).

Ces lignées cellulaires ont été mises en culture (37°C, CO<sub>2</sub> 5%) dans un milieu RPMI 1640, supplémenté en sérum fœtal de bœuf (15%), L glutamine (2mM), Peni-streptomycine (pénicilline :200 U/ ml ; streptomycine : 0,2 mg/ml).

- 15 L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'un culot cellulaire de GM16000C, d'un culot cellulaire de GM16028B ou de GM14899. Les cellules culotées sont soumises à une lyse hypotonique et à une digestion enzymatique par la protéinase K. Après déprotéinisation, l'ADN est précipité à l'éthanol, séché, et dissout dans de l'eau. La quantité et qualité de l'ADN étaient déterminées par spectrophotométrie UV.

- 20 *Echantillon de patients* - 200 µl de sang prélevés chez des patient dont la présence de la mutation Leiden était connu ont été utilisés. L'ADN génomique a été extrait par l'utilisation du kit NucleoSpin kit (Marcherey-Nagel, Hoerd, France), et repris dans 20 µl d'eau DNase-free. La quantité et qualité de l'ADN étaient déterminées sur gel agarose contenant du bromure d'éthidium, et par spectrophotométrie UV.

- 25 *Clonage de la région d'intérêt* : Afin d'obtenir une grande quantité d'ADN de la région susceptible d'exprimer la mutation Leiden du facteur V, une PCR a été réalisée à partir de l'ADN génomique tel qu'obtenu précédemment, à partir de lignées cellulaires ou d'échantillons sanguins, par l'utilisation d'une paire d'amorces d'amplification
- 30

comprenant la SEQ ID N° 3, 5' AGTGCTTAACAAGACCATACTA 3' pour la première amorce et la SEQ ID N°4, 5' AACAGACCTGGAATTTGAAACTAA 3' pour la deuxième amorce. Les paramètres de la PCR étaient les suivants: 2 min à 95°C; 30 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 55°C, 30 s à 72°C; suivis de 7 min à 72°C). Les amplicons ainsi obtenus étaient clonés dans un vecteur PCR-Trap (GeneHunter, USA) et vérifiés par séquençage. Les plasmides, contenant soit un nucléotide G soit un nucléotide A en position 1691 ont été amplifiés et purifiés par l'utilisation d'un kit Plasmid Maxi kit (Qiagen; Germany).

Afin d'obtenir une grande quantité d'ADN de la région susceptible d'exprimer la mutation 20210 du facteur II, une PCR a été réalisée à partir de l'ADN génomique tel qu'obtenu précédemment, à partir de lignées cellulaires ou d'échantillons sanguins, par l'utilisation d'une paire d'amorces d'amplification comprenant la SEQ ID N° 7, 5' TCTAGAAACAGTTGCCTGGC 3' pour la première amorce et la SEQ ID N°8, 5' CTACCAGCGTGCCACCAGGT 3' pour la deuxième amorce. Les paramètres de la PCR étaient les suivants: 2 min à 95°C; 30 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 55°C, 30 s à 72°C; suivis de 7 min à 72°C). Les amplicons ainsi obtenus étaient clonés dans un vecteur PCR-Trap (GeneHunter, USA) et vérifiés par séquençage. Les plasmides, contenant soit un nucléotide G soit un nucléotide A en position 1691 ont été amplifiés et purifiés par l'utilisation d'un kit Plasmid Maxi kit (Qiagen; Germany).

## 2) Amplification par NASBA

Afin de déterminer le génotypage de l'ADN prélevé d'un patient ou d'une lignée cellulaire, un mélange réactionnel d'amplification (40mM Tris HCl pH 8,5 ; 12 mM MgCl<sub>2</sub> ; 70 mM KCl ; 5 mM dithiothéitol ; 15% v/v DMSO ; 1 mM dNTP) contenant les amorces d'amplification permettant d'amplifier soit la région susceptible de contenir la mutation Leiden, soit la région susceptible de contenir la mutation 20210 du facteur II, et des sondes de détection, spécifiques de chaque mutation a été réalisé.

Ainsi, le milieu réactionnel permettant de détecter la présence de la mutation Leiden du facteur V comprenait :

- 0,2 µM (concentration finale) d'une première amorce d'amplification de SEQ ID N°2, 5' AGT GCT TAA CAA GAC CAT ACT A 3',

- 0,2  $\mu$ M (concentration finale) d'une deuxième amorce d'amplification de SEQ ID N°1, 5' AAA TTC TCA GAA TTT CTG AAA GG 3' comprenant le promoteur de la polymérase du phage T7, c'est à dire une amorce d'amplification dont la séquence totale correspond à la SEQ ID N°13, 5' aat tct aat acg act cac tat agg gag aAA ATT CTC AGA ATT TCT GAA AGG 3'
  - 0,2  $\mu$ M (concentration finale) de « molecular beacons » de SEQ ID N° 9, 5' CTG GAC AGG CGA IGA A 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg* CTGGACAGGCGAIGA*Acgatcg*-Dabsyl 3'). Ce « molecular beacon » permettait de mettre en évidence l'absence de la mutation Leiden.
  - 0,1  $\mu$ M (concentration finale) de « molecular beacons » de SEQ ID N° 10, 3' CTG GAC AGG CAA IGA A 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3', (séquence complète : 5' FAM-*cgatcg* CTGGACAGGCAAIGA*Acgatcg*-Dabsyl 3'). Ce « molecular beacon » permettait de mettre en évidence la présence de la mutation Leiden.
- Pour le facteur II ont été ajoutés dans le milieu réactionnel :
- 0,2  $\mu$ M (concentration finale) d'une première amorce d'amplification de SEQ ID N°6, 5' TTC TGG GCT CCT GGA ACC AA 3'
  - 0,2  $\mu$ M (concentration finale) d'une deuxième amorce d'amplification de SEQ ID N°5, 5' ATT ACT GGC TCT TCC TGA GC 3', comprenant le promoteur de la polymérase du phage T7, c'est à dire une amorce d'amplification dont la séquence totale correspond à la SEQ ID N°14
  - 0,1  $\mu$ M (concentration finale) de « molecular beacons » de SEQ ID N°11, 5' ACT CTC AGC AAG CCT CAA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cga tcg* ACT CTC AGC AAG CCT CAA *cga tcg*-Dabsyl 3'). Ce « molecular beacon » permettait de mettre en évidence la présence de la mutation 20210 du facteur II.
  - 0,2  $\mu$ M (concentration finale) de « molecular beacons » de SEQ ID N°12, 5' ACT CTC AGC GAG ICT CAA 3' marquées avec un fluorophore FAM (6-

carboxy-fluorescein) en 5', et d'un «quencher» (Dabsyl) en 3', (séquence complète : 5' FAM-cgg tcg ACT CTC AGC GAG ICT CAA cga ccg-Dabsyl 3'). Ce «molecular beacon» permettait de mettre en évidence l'absence de la mutation 20210 du facteur II.

5

Comme le montre la figure 1, le «molecular beacon» de SEQ ID N° 9, marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) est très spécifique de l'allèle sauvage : en effet, la fluorescence était exponentielle, avant l'apparition d'un plateau, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire n'exprimant pas la mutation Leiden (courbe en carré blanc ; figure 1a), alors que la fluorescence restait basale, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire exprimant la mutation Leiden (courbe en carré blanc ; figure 1b).

10

Le «molecular beacons» de SEQ ID N° 10, marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) est spécifique de l'allèle muté. En effet, la fluorescence était exponentielle, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire exprimant la mutation Leiden (courbe en triangle ; figure 1b), alors que la fluorescence restait basale, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire n'exprimant pas la mutation Leiden (courbe en triangle ; figure 1a).

15

Par l'utilisation de 2 fluorophores différents, le «molecular beacon» de SEQ ID N°9 pouvait être utilisé simultanément avec un «molecular beacon» de SEQ ID N°10, ce qui permettait de détecter très rapidement, et à partir d'une seule réaction, la présence ou l'absence de la mutation Leiden du facteur V. Les résultats sont présentés dans la figure 2, obtenue à partir d'une lignée cellulaire hétérozygote pour la mutation Leiden du facteur V.

20

Ces deux «molecular beacons», utilisées simultanément avec les amorces d'amplification de SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 permettent donc de différencier clairement les deux allèles.

25

Des résultats comparables étaient obtenus à partir d'échantillons cliniques.

30

Les résultats obtenus peuvent également être exprimés par le rapport entre la fluorescence émise lorsque le plateau est atteint et la fluorescence initiale (ratios O/C (open/close ratios) : plus le ratio est élevé, plus l'hybridation entre molecular beacon et l'amplicon est spécifique et plus la discrimination entre les deux allèles est importantes.



Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci dessous :

O/C RATIO	Lignée GM 1600C <i>Facteur V</i> G/G	Lignée GM 16028B <i>Facteur V</i> G/A	Lignée GM 14899 <i>Facteur V</i> A/A	Echantillon clinique <i>Facteur V</i> G/A	Echantillon clinique <i>Facteur V</i> G/G	Echantillon clinique <i>Facteur V</i> A/A
Beacons de SEQ ID N° 10	1,33	2,57	2,83	1,96	1,41	3,03
Beacons de SEQ ID N° 9	3,77	3,04	1,13	3,05	3,74	1,14

**Tableau 1 : ratio O/C obtenus sur des lignées cellulaires et des échantillons sanguins exprimant ou n'exprimant pas la mutation de Leiden**

5

Ces résultats démontrent que l'utilisation d'un «molecular beacon» de SEQ ID N°9 simultanément à l'amplification en NASBA avec une paire d'amorce d'amplification, comprenant une première amorce comprenant la SEQ ID N°1 et une deuxième amorce comprenant la SEQ ID N°2 permettait de détecter d'une manière très spécifique l'absence de la mutation Leiden. L'utilisation d'un «molecular beacon» de SEQ ID N°10 simultanément à l'amplification en NASBA avec une paire d'amorce d'amplification, comprenant une première amorce comprenant la SEQ ID N°1 et une deuxième amorce comprenant la SEQ ID N°2 permettait de détecter d'une manière très spécifique la présence de la mutation Leiden.

15

Comme le montre la figure 3, le «molecular beacon» de SEQ ID N°12, marquée avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) est très spécifique de l'allèle sauvage du facteur II. En effet, la fluorescence était exponentielle, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire n'exprimant pas la mutation 20210 (courbe en croix ; figure 3a), alors que la fluorescence restait basale, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire exprimant cette mutation (courbe en croix ; figure 3b).

20

Le «molecular beacons» de SEQ ID N° 11, marquée avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) est spécifique de l'allèle muté. La fluorescence était exponentielle, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire exprimant la mutation 20210 (courbe en rond ; figure 3b), alors que la fluorescence restait basale, lorsque la réaction était effectuée à partir d'une lignée cellulaire n'exprimant pas cette mutation (courbe en rond ; figure 3a).

25

Par l'utilisation de 2 fluorophores différents, le «molecular beacon» de SEQ ID N° 11 pouvait être utilisé simultanément avec un «molecular beacon» de SEQ ID N° 12, ce qui permettait de détecter très rapidement, et à partir d'une seule réaction, la présence ou l'absence de la mutation 20210 du facteur II. C'est ce qui est représenté figure 4, obtenue à partir d'une lignée cellulaire hétérozygote pour la mutation 20210 du facteur II. Des résultats comparables étaient obtenus à partir d'échantillon clinique.

De plus, selon un protocole comparable, 203 ADNs cliniques ont été génotypés. L'ensemble des résultats obtenus a été comparé aux résultats obtenus par une technique standard, la RFLP. Cette étude a montré 100% de concordance entre les 2 méthodes de génotypage.

Dans le but d'identifier la présence ou non des différents allèles du Facteur II et du Facteur V dans un même tube, des essais d'amplification simultanée des deux gènes en présence de 4 «molecular beacons» spécifiques de chaque allèle ont été réalisés. Les mêmes «molecular beacons» et couples d'amorces d'amplification que pour les amplifications des gènes seuls ont été utilisés, aux mêmes concentrations.

## REVENDICATIONS

1. Procédé in vitro pour le diagnostic/pronostic d'une thrombose comprenant les étapes suivantes :
  - 5           A - on extrait le matériel nucléaire d'un échantillon biologique,
  - B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire
  - C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons
- 10       caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 ; 3 à 8.
- 15       2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que lors de l'étape C), ladite sonde de détection comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°9 à 12
- 20       3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorces est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :
  - 25       □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
  - 30       □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
  - une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;

- ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8
- 5
4. Procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 3 dans lequel ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.
- 10
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel, lors de l'étape C, la sonde de détection comprend un fluorephore et un quencher.
- 15
6. Amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 ; 3 à 8
- 20
7. Amorce d'amplification selon la revendication 7 comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.
- 25
8. Paire d'amorce d'amplification choisie parmi les paires d'amorces suivantes :
- ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
  - ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
  - ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième
- 30

amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8

- 10      9. Paire d'amorce selon la revendication 9 dans laquelle ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

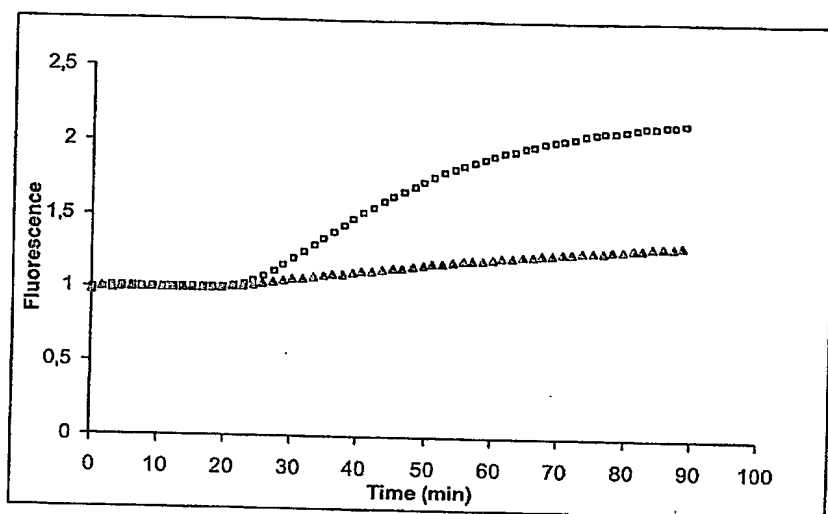
- 15      10. Utilisation d'au moins une amorce d'amplification selon la revendication 7 ou 8, et/ou d'une paire d'amorce selon la revendication 9 ou 10 lors d'une réaction d'amplification NASBA

11. Utilisation d'au moins une amorce selon la revendication 7 ou 8 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 9 ou 10 pour le diagnostic/pronostic d'une thrombose.

- 20      12. Kit pour le diagnostic/pronostic d'une thrombose comprenant au moins une amorce selon la revendication 7 ou 8 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 9 ou 10.

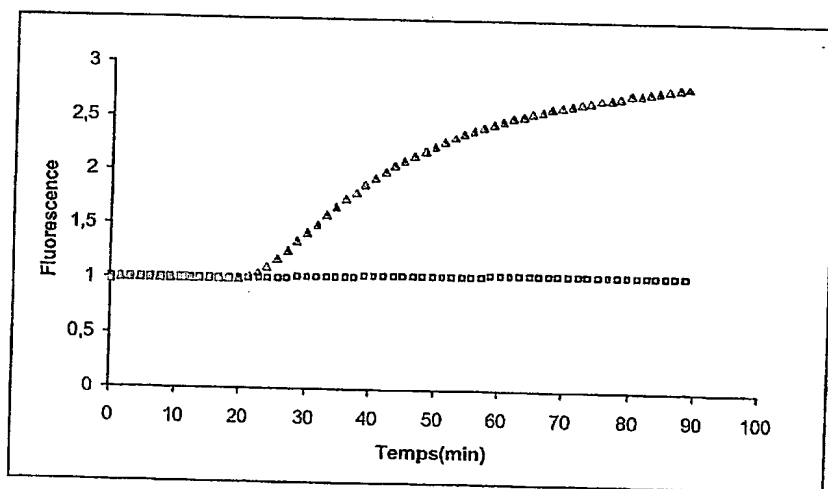
FIGURE 1/4

Figure 1a



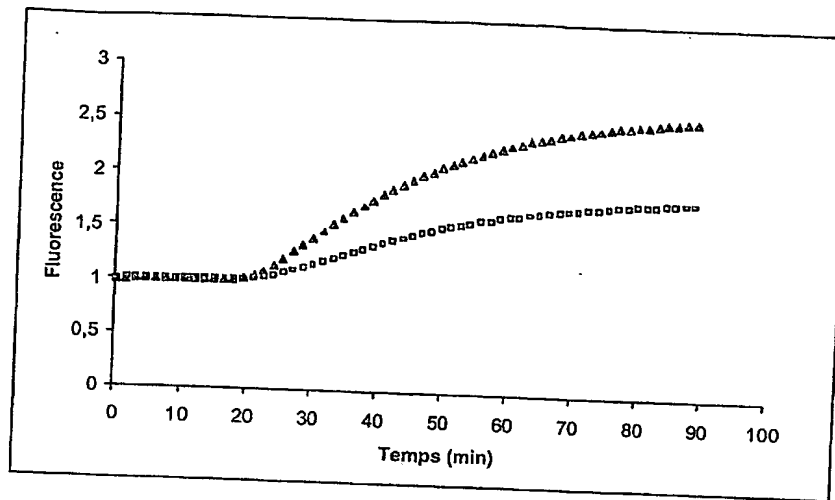
5

Figure 1b



10

FIGURE 2/4

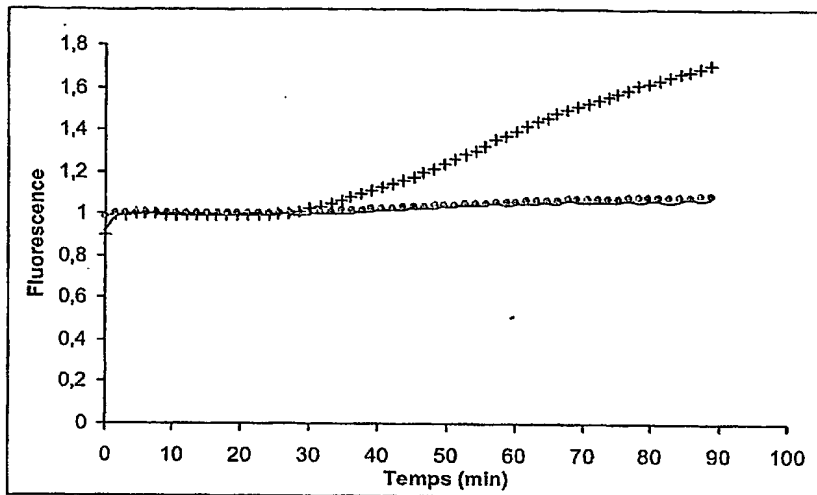


5

10

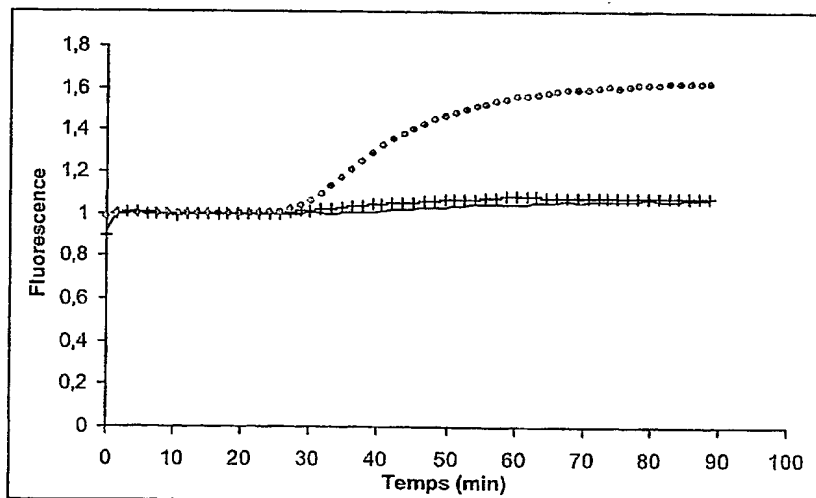
FIGURE 3/4

Figure 3a



5

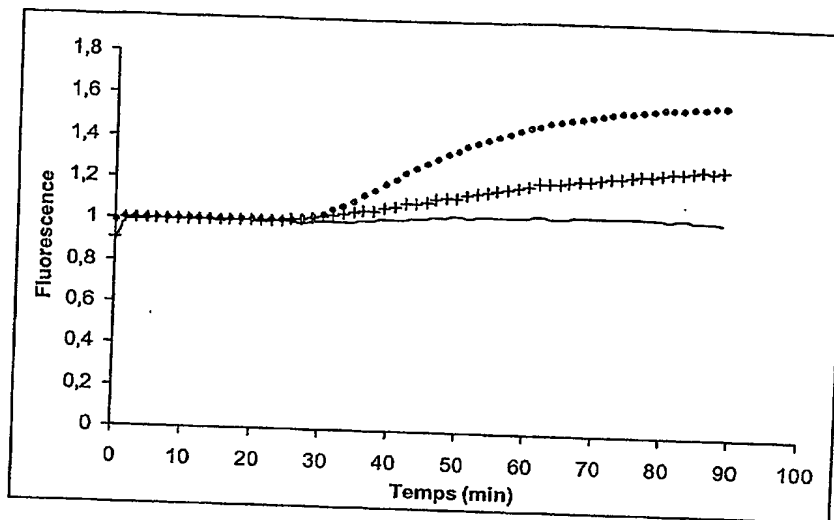
Figure 3b



10



FIGURE 4/4



SEQUENCE LISTING

<110> bioMérieux SA

<120> Procédé de diagnostic et/ou de pronostic de la thrombose

<130> Unknown

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1  
aaattctcag aatttctgaa agg

23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2  
agtgcttaac aagaccatac ta

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3  
agtgcctaac aagaccatac ta

22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4  
aacagacctg gaatttgaaa ctaa

24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5  
attactggct cttcctgagc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6  
ttctgggctc ctggaaccaa

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7  
tctagaaaca gttgcctggc

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

<400> 8  
ctaccagcgt gccaccaggt

20

<210> 9  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> n is inosine

<400> 9  
ctggacaggc gangaa

16

<210> 10  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> n is inosine

<400> 10  
ctggacaggc aangaa

16

1er dépôt

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 11

actctcagca agcctcaa

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

<223> n is inosine

<400> 12

actctcagcg agnctcaa

18

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 13

aattctaata cgactcacta tagggagaaa attctcagaa tttctgaaag g

51

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

1er dépôt

<213> homo sapiens

<400> 14

aattctaata cgactcacta tagggagaag gattactggc tcttcctgag c

51

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITE****Désignation de l'inventeur**

Vos références pour ce dossier	COAGULAM
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	Procédé de diagnostic/pronostic d'une thrombose
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	BERARD
Prénoms	Cécile
Rue	8/10 rue Pierre Cornille
Code postal et ville	69006 LYON
Société d'appartenance	bioMérieux
Inventeur 2	
Nom	LEISSNER
Prénoms	Philippe
Rue	49 rue Hector Berlioz
Code postal et ville	69009 LYON
Société d'appartenance	bioMérieux

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**Signé par**

Signataire: FR, BIOMERIEUX, F.Denjeau

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

PCT/FR2005/050083





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**